

THESIS

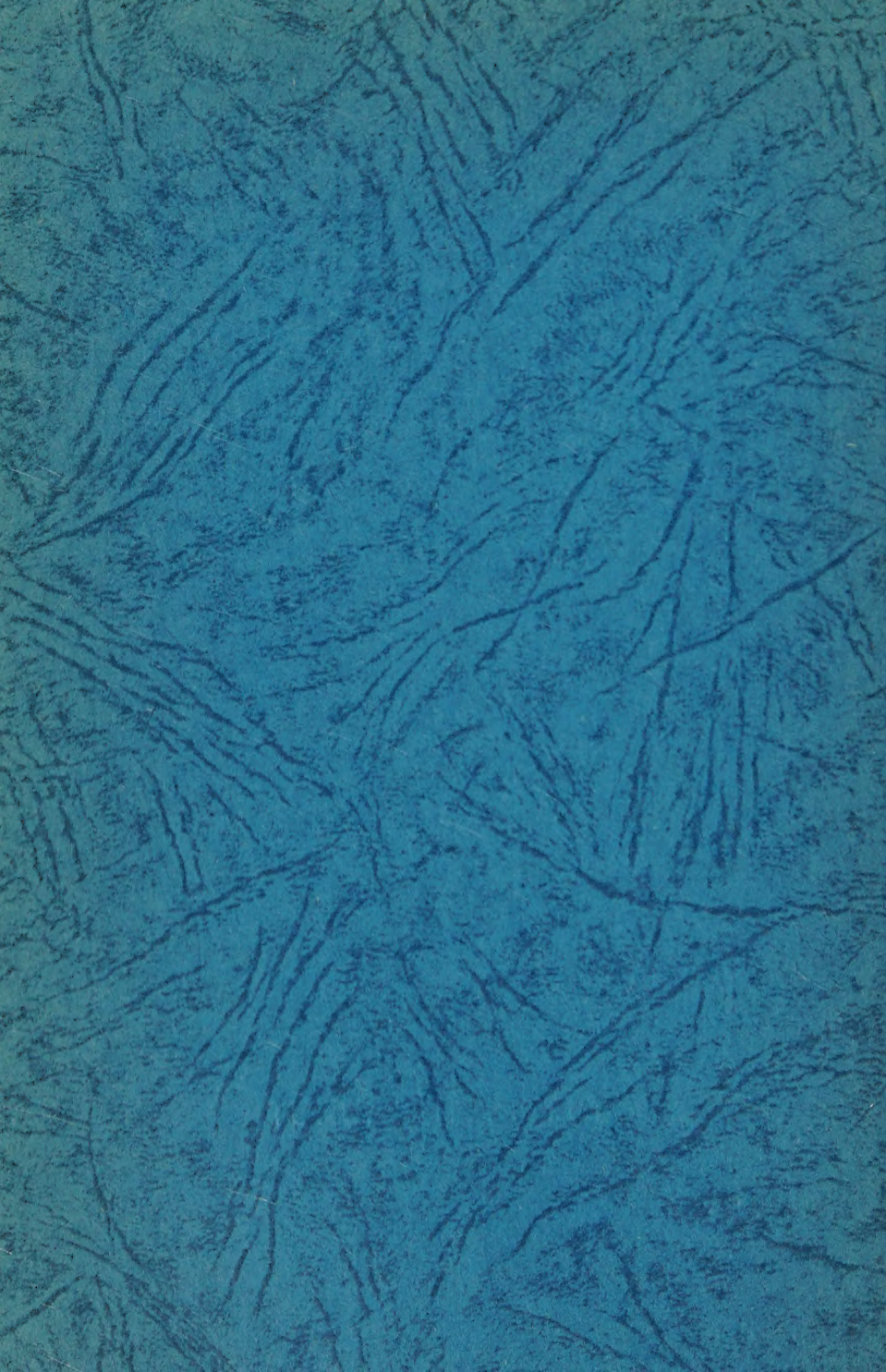
MUTZEN

1967

ISOLIERUNG UND
FERMENTATIVE BESTIMMUNG
VON PREGNANTRIOL AUS DEM URIN

KANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

DIETRICH RAUHUT





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

ISOLIERUNG UND FERMENTATIVE BESTIMMUNG VON PREGNANTRIOL
AUS DEM URIN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Dietrich Rauhut
aus München

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. J. Karl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1967

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Literaturübersicht	1
Isolierung und Strukturformel von Pregnantriol	1
Biosynthese von Pregnantriol	1
Einfluß von ACTH auf die Pregnantriolausscheidung	2
Pregnantriolausscheidung bei Gesunden und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	2
Bekannte Methoden zur Bestimmung von Pregnantriol	2
B Fragestellung der Arbeit	4
C Beschreibung einer neuen Methode zur Bestimmung von Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol	5
1. Reagentien	5
2. Isolierung von Pregnantriol	5
3. Endpunktbestimmung von Pregnantriol	8
4. Zuverlässigkeitskriterien der Methode	10
5. Die Anwendung der Methode zur Bestimmung von Pregnantriol	11
D Diskussion	12
1. Isolierung	12
a. Hydrolyse, Extraktion, Reinigung	12
b. Papierchromatographie	12
c. Identifikation und Reinheitsgrad des isolierten Steroids	16
α . Azetylierung	16
β . Ultraviolettpektrum	16
γ . Anteil an Metaboliten von Corticosteron und Cortisol im isolierten Steroid	17
2. Endpunktbestimmung	18
a. Vorteile der enzymatischen Endpunktbestimmung	19
b. Frage der Vergleichskuvette	19
c. Reaktion von Hydrazinhydrat mit DPN	20

	Seite
d. Gleichzeitiger Umsatz von Steroiden durch die β -Dehydrogenase	23
e. Versuch der Auftrennung des Enzyms auf Sephadex G 100 und G 200	23
E Zusammenfassung	25
F Literaturverzeichnis	28

A LITERATURÜBERSICHT

Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol wurde erstmalig von BUTLER und MARRIAN⁹ im Jahre 1937 aus dem Urin von zwei Patientinnen mit Nebennierenrindenhyperplasie isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Dieses Steroid leitet sich chemisch-systematisch vom Pregnan ab, das in Position 3, 17 und 20 eine Hydroxylgruppe, jeweils in α -Stellung trägt (Abb. 1). Aus dem Urin gesunder Personen wurde Pregnantriol erstmalig von COX und MARRIAN¹⁴ 1953 isoliert.

Vorstufen von Pregnantriol sind 17 α -Hydroxy-Progesteron und 17 α -Hydroxypregnenolon (Abb. 1). JAILER³⁵ fand nach oraler Verabreichung von 17 α -Hydroxy-Progesteron bei einer Versuchsperson einen Anstieg der Pregnantriolausscheidung von 1,8 mg auf 15 mg in 24 Stunden. Außerdem isolierte er bei vier Personen nach Gabe von 17 α -Hydroxy-Progesteron aus dem Urin 17 α -Hydroxy-Pregnanolon (Abb. 1).

BONGIOVANNI und EBERLEIN⁶ fanden nach Infusion von 17 α -Hydroxy-Progesteron, diesem Befund entsprechend, eine erhöhte Konzentration von Pregnantriol im Plasma.

FUKUSHIMA und BRADLOW²⁴ gaben einem Patienten mit Nebennierenrindenkarzinom gleichzeitig 5-Pregnen-3 β , 17 α -diol-20-on und 17 α -Hydroxyprogesteron in radioaktiver Form und fanden als wichtigste Vorstufe von Pregnantriol 5-Pregnen-3 β , 17 α -diol-20-on. Ebenso wurde bei einer gesunden Versuchsperson nach Gabe von 5-Pregnen-3 β , 17 α -diol-20-on in radioaktiver Form der Hauptteil dieses Steroids zu Pregnantriol metabolisiert (dabei wurde die Umwandlung zu 5-Pregnen-3 β -17 α , 20 α -triol außer Acht gelassen).

Die Biosynthese von Pregnantriol erfolgt in erster Linie in der Nebennierenrinde. Von PICKETT⁴³ wird angenommen, daß Pregnantriol auch im Ovar gebildet werden kann, da die Pregnantriolausscheidung bei gesunden Frauen und ebenso bei einer adrenalectomierten Frau in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus anstieg.

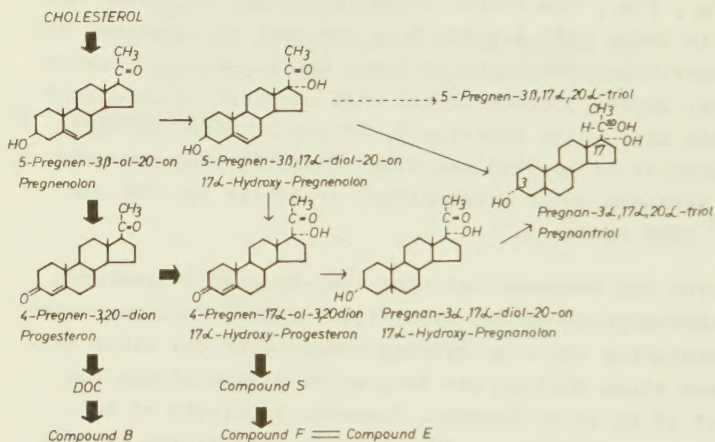


Abbildung 1: Schema der Biosynthese von Pregnantriol im Rahmen der Synthese von Nebennierenrindensteroiden.

Die Plazenta als weiterer möglicher Bildungsort für Pregnantriol wird von HERRMANN und SILVERMAN³⁰ diskutiert, da die Pregnantriolausscheidung während der letzten drei Schwangerschaftsmonate ansteigt und nach der Geburt rasch absinkt.

Daß ACTH die Pregnantriolausscheidung steigert, geht aus folgenden Untersuchungen hervor: CHILDS¹⁰ fand bei 18 gesunden Personen mit einer Pregnantriolausscheidung von 1,59 mg im Mittel nach 80 E.H. ACTH einen Anstieg um $1,06 \pm 0,30$ mg. Im Vergleich dazu stieg nach Stimulierung der Nebennierenrinde mit ACTH bei 20 Personen, deren Kinder ein adrenogenitales Syndrom hatten, die Pregnantriolausscheidung um etwa das Doppelte ($2,04 \pm 0,47$). Dieser Befund ließ den Schluß zu, daß eine heterozygote Anlage für das adrenogenitale Syndrom bei den Eltern vorliegt.

Klinische Bedeutung hat die quantitative Bestimmung von Pregnantriol vor allem zur Sicherung der Diagnose: Adrenogenitales Syndrom und zur näheren Abklärung des zugrunde liegenden Enzymdefektes.

Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Pregnantriolausscheidung bei Gesunden und bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. Da sehr unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Pregnantriol angewandt wurden, ist die Schwankungsbreite der Werte groß.

Zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Pregnantriol wurden bisher beschrieben:

Bei allen Arbeitsweisen sind Hydrolyse, Extraktion und Reinigung der Urinproben ähnlich.

Die Hydrolyse der hauptsächlich als Pregnantriolglucuronid im Urin ausgeschiedenen Verbindung erfolgt durch Inkubation mit β -Glucuronidase (2, 4, 7, 11, 12, 21, 23, 27, 29, 46, 47).

Einige Autoren extrahieren vor der Hydrolyse den Urin mit einem Gemisch aus Äther und Alkohol (2, 19, 47).

Die Extraktion wird mit Chloroform (12, 13, 27, 44, 46), Ben-

	Zahl der untersuchten Personen	Pregnantriol- ausscheidung in 24 Stunden	Methode	Literatur- angaben
Gesunde	19	0,94	Bongiovanni & Rivier (7)	42
	17	1,29	Faradin (21)	22
	24	0,18	Cox and Pincolstein (13)	15
	2	0,45	Cox (12)	12
	18	1,59	Bongiovanni & Clayton (4)	10
	2	0,59	Einoshitza & Ishigaki (34)	34
Essentielle Hypertonie, Brennen	9	1,50	Herrmann & Silverman (29)	29
	2	19,60	Cox (12)	12
	1	65,00	Farabass & Hallwacher (25)	25
	10	18,90	Ball and Varley (2)	2
	11	15,90	Hopson (44)	44
Nephrosen	5	25,50	Einoshitza & Ishigaki (34)	34
	5	12,65	Faradin (21)	22
Neuro- endokrin	1	6,40	Cox (12)	12
Cushing Syndrom	5	1,05	Ball and Varley (2)	2
	5	1,29	Faradin (21)	22
Essentielle Hypertonie	26	0,34	Homocystinyl (42)	42
	8	0,15	Homocystinyl (42)	42
	13	0,52	Homocystinyl (42)	42
Pruen Poliklinik	16	0,40	Stern (47)	47
	16	0,77	Faradin (21)	22
Ge- bärbare Frauen	16	1,90	Stern (47)	47
	16	1,50	Faradin (21)	22
Pruen Poliklinik	16	5,00	Herrmann & Silverman (29)	29
Essentielle Hypertonie	15	normal (1,29)	Faradin (21)	22
Essentielle Hypertonie	8	normal (1,29)	Faradin (21)	22
Neuro- endokrin	1	0,50	Faradin (21)	22
Adipositas	5	normal (1,29)	Faradin (21)	22

Abbildung 2: Die Ausscheidung von Pregnantriol bei Gesunden und bei Personen mit verschiedenen Erkrankungen (aus der Literatur).

zol (2, 23, 47) oder Dichlormethan (7, 40) durchgeführt, die Reinigung des Extraktes mit Natronlauge und anschließendem Waschen mit Wasser. (2, 4, 7, 11, 12, 21, 23, 27, 29, 46, 47)

Die Isolierung des Pregnantriols aus dem Neutralextrakt erfolgt auf verschiedene Weise:

1. durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd, (2, 4, 7, 23, 47) an Florisil, (21, 29, 42) an Silicagel. (27, 42)
2. durch Papierchromatographie (11, 12, 40, 42)
3. durch Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxyd ⁴⁶.

Die Endpunktbestimmung wird ausgeführt:

1. mittels einer Farbreaktion in konzentrierter Schwefelsäure (2, 4, 7, 21, 23, 27, 42, 46, 47)
2. durch Messung des nach der Oxydation mit Natriumbismuthat entstehenden 17-Ketosteroids als Zimmermannchromogen. ²⁹
3. durch Messung des bei der Oxydation mit Perjodsäure freierwerdenden Azetaldehyds. ¹²
4. durch Gaschromatographie. ³⁴

B FRAGESTELLUNG der ARBEIT

Die große Zahl der bisher für die Bestimmung von Pregnantriol angegebenen Methoden läßt vermuten, daß ein optimaler Nachweis dieses Steroids für klinische Zwecke nicht vorliegt. Es zeigte sich auch bei einem Vergleich der Resultate bei Pregnantriolbestimmungen im Urin mit zwei verschiedenen Methoden, daß die Resultate beträchtlich voneinander abwichen. (NOWACZYNSKI⁴²). Wir haben uns deshalb die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, ob eine enzymatische Bestimmung von Pregnantriol mit α -Hydroxysteroiddehydrogenase möglich ist. Dies setzte allerdings voraus, daß das Steroid mittels Chromatographie in verschiedenen Systemen möglichst rein separiert wurde. Die Methode sollte auch für klinische Problemstellungen anwendbar sein.

C

Neue METHODE zur Bestimmung von Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol

1. Reagentien:

Antimonpentachlorid, wasserfrei, ca. 99 %, Dr. Theodor Schuchardt GMBH Co München; Äthanol absolut p.A., Merck's Reagentien 972; Tetrazolium Blue, Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland Ohio; Chloroform, p.A. Merck's Reagentien 2445; Diphosphopyridinnucleotid DPN 15300, C. F. Boehringer und Söhne GmbH Mannheim; Essigsäure, 50 %ig; Filtrierpapier, Schleicher und Schüll 595 1/2 und 1117 1/2; β -Glucuronidase, Fishman-Einheiten, Schering A.G. Berlin; Hydraziniumhydroxyd etwa 24 %, Merck's Reagentien 4600; Isooctan für Ultraviolettspektroskopie, Merck's Reagentien 4718; Methanol p.A. Merck's Reagentien 6009; Molybdätophosphorsäure p.A., Merck's Reagentien 532; Natriumacetatlösung 0,2 m; Natronlauge, 1 n; Natriumsulfat, wasserfrei, Merck's Reagentien 6649; Natrium-pyrophosphat p.A., Merck's Reagentien 6591; Sephadex G 100 und G 200, Pharmacia Uppsala, Sweden; Steroiddehydrogenase, 5 gm, for Chemical and Investigational Use only. Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio; Toluol p.A. Merck's Reagentien 8325; Papier zur Chromatographie: Schleicher und Schüll Nr 2043 b Mgl und Whatman Filter Paper Grade no II; Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol, 10 mg, Schering A.G. Berlin.

2. Isolierung von Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol

Hydrolyse: 1/10 der filtrierten Urintagesmenge (Volumen V) wird in einem Erlmeyerkolben mit V/10 0,1 m Natriumacetat und V/10 0,1 m Essigsäure versetzt. Der pH-Wert wird mit dem pH-Meter durch Zusatz von Essigsäure auf 4,6 eingestellt. Nach Zusatz von 350 E.H. β -Glucuronidase pro ml Urin wird der Erlmeyerkolben verschlossen für 24 Stunden bei 47° C in einen Brutschrank gestellt.

Extraktion: Das Hydrolysat wird in einem Scheidetrichter zwei mal mit je 6/5 V Chloroform je 20 Minuten auf einer

Schüttelmaschine extrahiert. Die Emulsion der vereinigten Chloroformextrakte wird durch Zentrifugieren beseitigt.

Reinigung: Der Chloroformextrakt wird mit V/10 1 n Natronlauge 30 Sekunden geschüttelt und die Natronlauge verworfen. Der Rückstand wird zwei mal mit V/10 destilliertem Wasser nachgewaschen. Nach Zusatz von ≈ 8 g Natriumsulfat wird der Extrakt filtriert und in einem Rundkolben im Vakuum zur Trockne gebracht.

1. Papierchromatographie: Der Extrakt wird nach Lösen in Chloroform halbiert, in zwei Spitzgläser überführt und abgedampft. Der Inhalt eines jeden Glases wird nach Lösen in Methanol mit Hilfe einer Kapillare quantitativ auf zwei Streifen Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll Nr 2043b Mgl), dessen Ausmaße aus Abb. 3 hervorgehen, aufgetragen. Die aufgetragene Zone soll nicht breiter als 4 mm sein. Auf einen dritten Streifen werden 20 μ Pregnantriol als Leitsubstanz aufgetragen. Das Chromatogramm wird nach zweistündiger Äquilibrierdauer bei 23° C sechs Stunden bei derselben Temperatur absteigend im System NB₂ (Toluol: Isooctan: Methanol: Wasser = 15 : 5 : 16 : 4)¹¹ entwickelt. Dabei erreicht die Lösungsfront gerade das Ende des Papierstreifens. Nach Entfernen aus dem Tank trocknet das Chromatogramm in wenigen Minuten an der Luft. Nun wird es unter einer UV-Lampe bei 240 m μ betrachtet und beurteilt, ob es gleichmäßig gelaufen ist. Pregnantriol, das an sich UV negativ ist, hat jedoch denselben R_F-Wert wie eine in der Mitte von Streifen 1 und 2 sichtbare, UV-positive Substanz (Abb. 3). Streifen 3 mit der Reinsubstanz Pregnantriol wird nun durch eine 4 %ige alkoholische Lösung von Phosphomolybdänsäure gezogen. Der Streifen sollte dabei nur die Oberfläche berühren. Überschüssige Lösung wird zwischen Filtrierpapier abgepreßt. Anschließend wird der Chromatographiestreifen bei 80° C fünf Minuten getrocknet (EBERLEIN¹⁷). Das Pregnantriol erscheint als dunkelgrauer Fleck auf grünem Grund. Es hat unter den angegebenen Versuchsbedingungen einen R_F-Wert von 0,42 - 0,46.

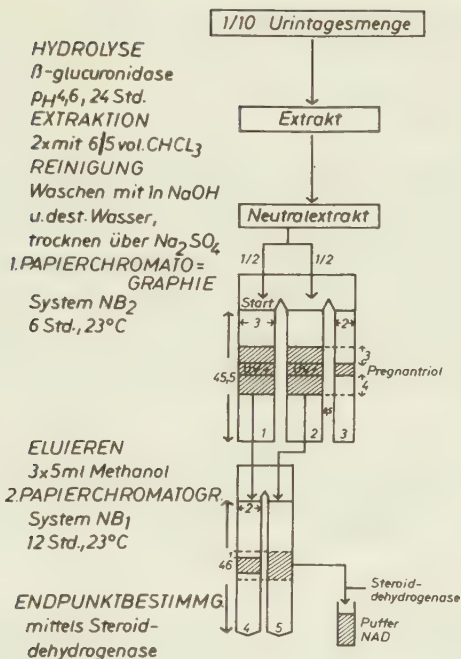


Abbildung 3: Schema der Methode zur Bestimmung von Pregnantriol.

Entsprechend dem angefärbten Bezirk auf Streifen 3 (Pregnantriol) werden nun aus den Streifen 1 und 2 Zonen ausgeschnitten (gegen die Lösungsfront um 4 cm, gegen den Start um 3 cm verlängert, Abb. 3).

Um sicher zu gehen, daß auf dem Chromatogramm vorhandenes Pregnantriol quantitativ ausgeschnitten wurde, ist es ratsam, die angrenzenden Teile der ausgeschnittenen Pregnantriolzone auf Streifen 1 nachträglich mit 10 %iger Antimonpentachloridlösung in Chloroform (HERMAN²⁸) zu behandeln. Tritt eine Gelbfärbung dieser Enden auf (erfahrungsgemäß bei einer Ausscheidung von über 2 mg pro Tag), müssen auf Streifen 2 nachträglich die entsprechenden Zonen ausgeschnitten werden. Es wird dann das Eluat aus Streifen 2 in 5 Teile geteilt und 2 Teile davon auf das zweite Chromatogramm (NB₁) übertragen. Zur Endpunktbestimmung gelangt so 1/100 der Urinagesmenge.

Die in kleine Stücke geschnittenen Zonen aus Streifen 1 und 2 werden getrennt zwei mal je eine Stunde bei 47° C mit je 5 ml Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum zur Trockne abgedampft und quantitativ in Spitzgläser überführt.

2. Papierchromatographie (Abb. 3): Die Eluate aus Streifen 1 und 2 werden in gleicher Weise wie beim ersten Chromatogramm je auf ein zweites Papierchromatogramm (Schleicher und Schüll Nr. 2043b Mgl) aufgetragen, dessen Ausmaße aus Abb. 3 hervorgehen. Das Chromatogramm wird nach 15 Stunden Äquilibriumdauer bei 23° C zwölf Stunden bei derselben Temperatur absteigend im System NB₁ (Toluol: Isooctan: Methanol: Wasser = 5 : 5 : 7 : 3; EBERLEIN¹⁸) entwickelt.

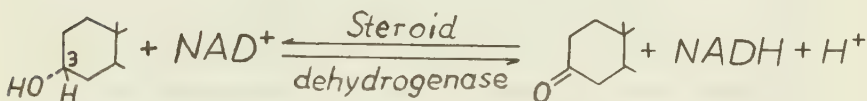
Streifen 4 (Abb. 3) wird, wie beschrieben, durch eine Lösung von Phosphomolybdänsäure gezogen und bei 40° C etwa zwei Stunden getrocknet. Das Pregnantriol hat in diesem System einen R_S-Wert (S = Corticosteron) von 1,3.

Eine um je 1 cm nach oben und unten verlängerte Zone, entsprechend dem angefärbten Bezirk auf Streifen 4, wird aus Streifen 5 ausgeschnitten und eluiert.

3. Endpunktbestimmung von Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol

a) Einführung

Die quantitative Bestimmung des Pregnantriols erfolgt mittels einer α -Hydroxysteroiddehydrogenase, deren Bildung in einem Bakterienstamm (*Pseudomonas testosteroni*) induziert wird, wenn das Nährmedium als einzige Kohlenstoffquelle Testosteron enthält. (MARCUS³⁹) Dieses Enzym überträgt den Wasserstoff des Pregnantriols aus Position 3 auf NAD⁺, das dem Testansatz zugefügt wird. Es entstehen das Keton von Pregnantriol und NADH. Die Reaktion läuft also im Prinzip folgendermaßen ab:



Zur Verschiebung des Gleichgewichts nach der rechten Seite wird der Ansatz bei hohem pH-Wert und einem Überschuß an NAD durchgeführt. Außerdem wird Hydrazinhydrat zugesetzt, das mit dem entstehenden Keton ein Hydrazon bildet (HURLOCK³²). Gemessen wird das entstehende NADH im optischen Test nach Warburg.

b) Isolierung der α -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *Pseudomonas testosteroni*.

Das Enzym wurde aus einem Trockenpulver aus *Pseudomonas testosteroni* nach der vereinfachten Methode von STEMPFEL⁴⁸ dargestellt:

"Ein Gramm des Trockenpulvers wird in 10 ml 0,2 M Trispuffer, pH 7,5, aufgeschwemmt und eine Stunde bei 40°C stehengelassen. Diese Suspension wird dann mit 50 ml Aceton, das auf -15°C vorgekühlt wurde, behandelt. Das Präzipitat wird auf einem Buchner Filter aufgefangen. Der Niederschlag wird zwei

mal mit kaltem Aceton gewaschen, in 10 ml Trispuffer (pH 9,5) suspendiert, 20 Minuten stehengelassen, und dann in der Kälte bei 10 000 g 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, der Rest mit Puffer extrahiert und wieder zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt."

c) Die quantitative Bestimmung von Pregnantriol wird wie folgt durchgeführt: Dem auf dem Boden eines Reagenzglases abgedampften Eluat von Pregnantriol aus dem Chromatographiesystem NB₁ werden 0,1 ml Methanol, 1 ml 0,1 M Natriumpyrophosphatlösung (pH 9,5), 1 ml 1 M Hydrazinhydrat (pH 9,5), 0,1 ml 5×10^{-3} M NAD und 0,75 ml dest. Wasser zupipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wird der Inhalt des Reagenzglases in eine Quarzkuvette von 1 cm Breite überführt. In einem Photometer (Eppendorf) mit angeschlossenem Schreiber wird zunächst ein Vorlauf von einigen Minuten aufgenommen. (Meßstrahlung 334 mμ, Meßtemperatur 25° C durch einen heizbaren Kuvettenhalter). Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 0,05 ml Enzymlösung. Sie ist beendet, sobald der Nachlauf einige Minuten geradlinig verläuft (Abb. 4).



Abbildung 4: Verlauf der Extinktion bei der enzymatischen Endpunktbestimmung (mittels der α -Hydroxysteroiddehydrogenase) von Pregnantriol.

Nun werden erneut 0,05 ml des Enzyms zugesetzt. Die Zunahme der optischen Dichte (Enzymsprung) gibt die Eigenabsorption

des Enzyms an (ΔOD_E). Als Extinktionsänderung ΔOD ergibt sich: $\Delta OD = \Delta OD_1 - \Delta OD_E$ (ΔOD_1 = extrapolierter Wert).

Die Berechnung gestaltet sich einfach, da entsprechend der Oxydation von Pregnantriol äquivalente Mengen von NADH entstehen (STEMPFL 48).

$$\mu M \text{ Pregnantriol} = \mu M \text{ NADH} = \frac{\Delta OD_{334 \text{ m}\mu} \times 3}{6,09 \text{ (molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei } 334 \text{ m}\mu)} \quad 1$$

μg Pregnantriol = μM Pregnantriol $\times$ 336 (Molekulargewicht)

Ausscheidung von Pregnantriol/die = μg Pregnantriol $\times$ 20.

4. Orientierende Untersuchungen über Zuverlässigkeitskriterien der Methode

In 1/20 einer Urintagesmenge (1000 ml) wurde nach der beschriebenen Methode Pregnantriol bestimmt. Es ergaben sich 17 μ Pregnantriol/ 1/40 Urintagesmenge.

Einem weiteren 1/20 desselben Urins werden nach Hydrolyse 20 μ Pregnantriol zugesetzt. Es wurden 25,3 μ / 1/40 Urintagesmenge gemessen; erwartet wurden 27 μ . Das entspricht einem Recovery von 83 %.

Dieser Verlust kommt hauptsächlich während der Extraktion zustande, da beim Zusatz von Pregnantriol nach der Extraktion ein "Recovery" von 98 % erzielt wurde.

Doppelbestimmungen zeigten folgende Ergebnisse:

30,4 μ und 29,4 μ (entsprechend 1/100 der Urintagesmenge)
17,6 μ und 18,4 μ (entsprechend 1/20 der Urintagesmenge)
110 μ und 105 μ (entsprechend 1/100 der Urintagesmenge).

Die Spezifität der Methode ist vor allem durch die Separierung in zwei Chromatographiesystemen gewährleistet, wie in der Diskussion im einzelnen nachgewiesen wurde.

Die Empfindlichkeit der Methode hängt vom benützten Spektrophotometer, den Abmessungen der Kuvette und dem Reaktionsvo-

lumen ab. Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit (um den Faktor 200) wäre durch Fluoreszenzmessung möglich (LOWRY³⁸).

5. Die Anwendung der Methode zur Bestimmung von Pregnantriol

Die Ergebnisse bei normalen Personen und bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (Tabelle).

Bei acht gesunden Personen wurde Pregnantriol im Urin bestimmt. Dabei ergab sich für Erwachsene ein Mittelwert von etwa $1,5 \text{ mg}/24^{\text{h}}$ und für Kinder von $0,4 \text{ mg}/24^{\text{h}}$.

Beim adrenogenitalen Syndrom wurde erwartungsgemäß eine hohe Ausscheidung von durchschnittlich 7 mg beobachtet.

Eine exzessive Pregnantriolausscheidung (11 mg) zeigte ein Patient mit Nebennierenrindenkarzinom; außerdem wurde von ihm auch die in der Diskussion näher bezeichnete Substanz I in sehr großen Mengen ausgeschieden.

In zwei Fällen von M. Addison ergaben sich stark erniedrigte Pregnantriolausscheidungen.

Bei 3 Patienten mit Cushing-Syndrom wurde eine normale Pregnantriolausscheidung festgestellt.

Da die meisten dieser Pregnantriolbestimmungen zu einem Zeitpunkt ausgeführt wurden, als die Methode noch bis zu der jetzt vorliegenden Form verbessert wurde, und da die Zahl der Untersuchungen relativ klein ist, dürfen die Ergebnisse nicht überbewertet werden, sondern insbesondere als Demonstration für die Anwendbarkeit der Methode gelten.

Untersuchte Personen	Tagesurin (ml)	C-17-Keto steroides mg/24 ^h	C-17-OH steroides mg/24 ^h	Pregnantriol mg/24 ^h	
D.R.	890			1,65 ^{xx}	
G.R.	1800			1,28 ^{xx}	
F.W.	800			0,18 ^{xx}	
U.R.	770			0,66	gesunde
R.S.	800			0,14 ^x	Personen
D.R.	1320			3,04	
U.R.	1000			0,70	
D.R.	900			0,97 ^{xx}	
J.H.	1600	21,3	6,3	0,28 ^{xx}	Morbus Addison
W.	1480	7,6	1,2	0,10 ^{xx}	(substit. mit Cortisol)
G.Z.	1850	29,9	5,1	1,7 ^{xx}	Cushing Syndrom
V.	650		6,7	0,3 ^x	(NNR-Hyperplasie)
R.K.	1300			2,9	
C.H.	800			6,2 ^{xx}	Adrenogenitales Syndrom
R.H.	800			7,9 ^{xx}	
G.K.	600	9,0	9,4	0,83 ^x	Nebennierenrindenkarzinom (postop.)
I.M.	1200			11,0	
E.W.	700		2,5	1,35 ^x	Hyperthyreose
K.S.	250	6,5	1,5	0,21 ^x	Gonadendysgenese
C.S.	1000			0,42 ^{xx}	Hypogonadismus

Tabelle : Pregnantriolausscheidung bei gesunden Personen und bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.

^x: Als zweites Chromatographiesystem diente E₄.

^{xx}: Die Endpunktbestimmung erfolgte nach Halbierung des Extraktes und gegen eine Leerkuvette, die u.a. inaktives Enzym enthielt. Als zweites Chromatographiesystem diente E₄.

D DISKUSSION

Besprechung und Kritik der Methode

1. Isolierung

Hydrolyse: Pregnantriol wird im Urin als Schwefelsäureester und Glucuronid ausgeschieden. Das Mengenverhältnis dieser beiden Ester wird verschieden angegeben. Nach BONGIOVANNI⁴ liegt Pregnantriol hauptsächlich als Glucuronid vor, während nach Untersuchungen von CREPY¹⁵ Pregnantriol zu 50 % als Glucuronid und zu 50 % als Schwefelsäureester ausgeschieden wird.

BONGIOVANNI⁴ konnte nachweisen, daß Pregnantriol bei heißer Säurehydrolyse in ein Steroid umgewandelt wird, das nicht identifiziert ist. Daher ist die Hydrolyse mit β -Glucuronidase vorzuziehen. Der Schwefelsäureester von Pregnantriol wird allerdings dann nicht erfaßt. Einige Autoren fanden β -Glucuronidase Inhibitoren (JACOBS³³, STERN⁴⁷). EDWARDS¹⁹ und STERN⁴⁷ schlagen daher vor, den Urin vor der Bebrütung mit Äthanol: Äther = 1 : 3 zu extrahieren und diese auszuschalten. LEON³⁷ hält es jedoch für wahrscheinlich, daß bei einer solchen Vorextraktion größere Mengen von Pregnantriolconjugaten verloren gehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Hydrolyse des Urins mit β -Glucuronidase ohne Vorextraktion mit 350 E.H. pro ml Urin durchgeführt.

Extraktion und Reinigung erfolgt nach dem üblichen Vorgehen.

1. Papierchromatographie: Das erste Lösungsmittelsystem sollte so beschaffen sein, daß eine weitgehende Abtrennung der Lipide und Pigmente vom Pregnantriol erfolgt. Das Pregnantriol sollte dabei annähernd einen für die Papierchromatographie optimalen R_f -Wert von 0,5 haben. Außerdem sollte, der leichtereren Handhabung wegen, ein System vom BUSH Typ gewählt werden. System B₅ (Benzol: Methanol: Wasser = 2 : 1 : 1), das

nach Angaben von NOWACZYNSKI⁴² als brauchbar erschien, bewährte sich nicht, da die Zone mit dem Pregnantriol die endständige Lipidzone des Chromatogramms teilweise überdeckte, und zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit des Pregnantriols auf Streifen 1 und 3 (extrahiertes Pregnantriol und Reinsubstanz) eine deutliche Diskrepanz bestand. Dies dürfte durch die zahlreichen Begleitstoffe des Extraktes bedingt sein.

Sehr gut eignete sich dagegen das von DE COURCY¹¹ vorgeschlagene System NB₂ (Toluol: Isooctan: Methanol: Wasser = 15 : 5 : 16 : 4). Die angegebene Äquilibrierdauer von 5 Stunden erwies sich als zu lange, da in dieser Zeit der aufgetragene Extrakt zu weit auseinanderdissoziierte und die Auftrennung der Steroide dementsprechend schlecht war. Optimal war eine 2-stündige Äquilibrierdauer.

Um Pregnantriol auf dem Chromatographiepapier sichtbar zu machen, wurden folgende Farbreaktionen untersucht: Die von DE COURCY¹¹ angegebene Färbemethode mit Trichloressigsäure ergab erst bei einer Konzentration von 50 μ Pregnantriol (pro $\approx$ 2 qcm) eine ganz schwache Blaufärbung. Da sich jedoch auf dem Chromatogramm oft nur Mengen von 20 μ Pregnantriol befanden, war diese Methode zu unempfindlich.

Die Färbung mit Phosphomolybdänsäure (EBERLEIN¹⁷) erwies sich als zu unspezifisch, da sich weite Bereiche des Chromatogramms (System NB₂) anfärbten.

Die Färbung mit Phosphorsäure nach NEHER⁴¹ eignete sich auf Papier nicht, da dieses durch die Säure zu stark angegriffen wurde.

Erst die Färbung mit Antimonpentachlorid (HERMAN²⁸) zeigte ausreichende Spezifität und Empfindlichkeit, wobei sich das Eintauchen des Streifens in die Antimonpentachloridlösung noch besser bewährte als das Besprühen des Streifens mit der Lösung (HERMAN²⁸). An der Stelle des Pregnantriols entwickelte sich ein gelber Farbfleck auf dem Chromatogramm (Abb. 5).

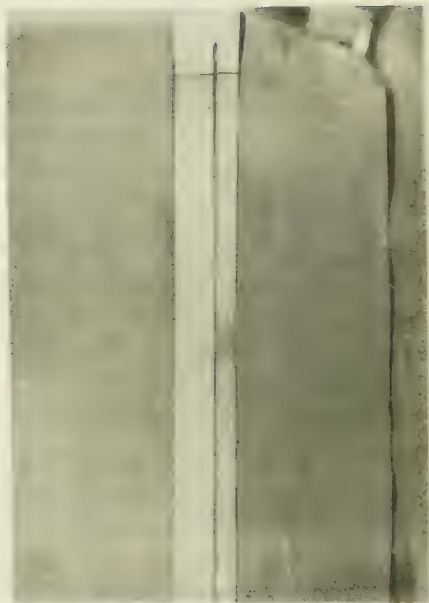


Abbildung 5: Chromatogramm eines Urinextraktes und der Reinsubstanz Pregnantriol (System NB₂).

Nach Färbung mit Antimonpentachlorid:

Breiter Streifen: Gelbe Zone = Pregnantriol

Rosa Zone = "Substanz I"

Nach Färbung mit Phosphomolybdänsäure:

Schmaler Streifen: Graue Zone = Pregnantriol,
Reinsubstanz.

Eluiert wurde zwei mal eine Stunde mit je 5 ml Methanol. 98 % des auf das Papier aufgetragenen Pregnantriols wurden auf diese Weise im Eluat wiedergefunden. Andere Elutionsmittel (Äthanol: Äthylacetat = 1 : 2; Methanol: Äthylacetat = 1 : 2; Dichlormethan: Methanol = 2 : 1) ergaben dasselbe Recovery.

Da die quantitative Übertragung des Extraktes auf das Papier eine relativ große Menge an Lösungsmittel erfordert, ist sie sehr zeitraubend. Es wurde versucht, die von BUSH⁸ angegebene Methode, nach der der Extrakt auf eine größere Fläche des Papierstreifens aufgetragen und dann in einem geeigneten Lösungsmittelsystem auf die Startlinie konzentriert wird, zu benutzen.

Als Lösungsmittel wurden verwandt Äthylacetat: Methanol = 2 : 1 und reines Äthylacetat. Es zeigte sich jedoch nach Anfärbung mit Phosphomolybdänsäure, daß das Pregnantriol nicht vollkommen von der Lösungsfront mitgenommen wurde. Dadurch ergab sich eine doppelt bis dreifach so breite Start"linie" als nach direktem Auftragen des Extraktes mit einer Kapillare.

2. Papierchromatographie: Das 2. Lösungsmittelsystem sollte sich in seinen Eigenschaften ausgeprägt von dem ersten unterscheiden, um Substanzen, die im ersten System den gleichen R_f -Wert wie Pregnantriol haben, abzutrennen. Außerdem sollte das Pregnantriol eine möglichst schmale, scharf begrenzte Zone auf dem Papierstreifen ergeben. System E_5 (Isopropyläther 400 ml, tert.-Butanol 250 ml, Wasser 300 ml), in dem Pregnantriol nach Angaben von EBERLEIN¹⁸ eine günstige Wanderungsgeschwindigkeit hat, erwies sich als ungeeignet, da Pregnantriol unter unseren Versuchsbedingungen dabei mit der Lösungsfront wandert. In System E_4 (Toluol: Methanol: Wasser = 2 : 1 : 1) und in System BUSH C (Toluol: Äthylacetat: Methanol: Wasser = 9 : 1 : 5 : 5) zeigte Pregnantriol eine breite, unscharf begrenzte Zone. In einem von FUKUSHIMA²⁴ angegebenen

System (Isooctan: Methanol: Wasser = 10 : 10 : 1) zeigte Pregnantriol einen zu geringen R_f -Wert; es wanderte in 50 Stunden nur 7 cm.

System E_4 (Isooctan: tert.-Butanol: Methanol: Wasser = 20 : 9 : 9 : 2; EBERLEIN¹⁸) erschien zunächst bei einer Äquilibrierzeit von 1 Stunde und einer Laufzeit von 18 Stunden als geeignet. Es zeigte sich jedoch, daß die Zone mit Pregnantriol teilweise überlagert wird von 2 Substanzen mit folgenden Eigenschaften:

Substanz I: R_f -Wert $\leq R_f$ -Wert des Pregnantriols; UV negativ (240 m μ); Dinitrobenzol negativ; BT negativ (Blautetrazolium 0,1 %; Natronlauge 2 n = 1 : 9; Phosphomolybdänsäure negativ; die Substanz färbt sich mit Antimonpentachlorid rosa (Abb. 5). Da bei Zugabe von Steroiddehydrogenase in einem analogen Ansatz wie zur Bestimmung von Pregnantriol mit dieser Substanz I eine Reaktion abläuft, und da bei Hemmung des α -Enzyms durch p-Hydroxymercuribenzoat (STEMPFEL⁴⁸) keine Reaktion abläuft, muß die Substanz ein Steroid mit einer 3α -Hydroxygruppe sein.

Substanz II: R_f -Wert $\geq R_f$ -Wert des Pregnantriols; UV negativ; BT negativ; Phosphomolybdänsäure negativ; die Substanz färbt sich mit Dinitrobenzol nach SAVARD⁴⁵ sofort rotviolett. (Abb. 6)

Da ja die Substanz I wie Pregnantriol in die Endpunktbestimmung mit eingeht, und somit das Ergebnis verfälscht, wurde das System NB₁ (Isooctan: Toluol: Methanol: Wasser = 5 : 5 : 7 : 3; EBERLEIN¹⁸) vorgezogen, in dem eine weitgehende Abtrennung der Substanzen I und II vom Pregnantriol möglich ist.

Die Färbung des Parallelstreifens 4 (Abb. 3) erfolgte nach EBERLEIN¹⁷ mit einer 4 %igen alkoholischen Phosphomolybdänsäurelösung. Der Nachweis für Pregnantriol wurde jedoch noch empfindlicher, wenn der Papierstreifen nicht, wie angegeben,

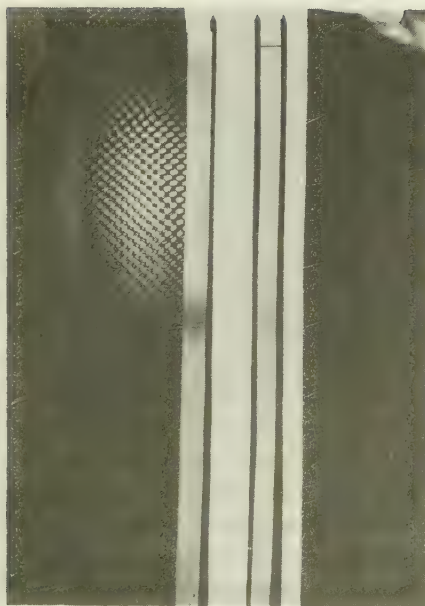


Abbildung 6: Chromatogramm eines Urinextraktes und der Reinsubstanz Pregnantriol (System E_4).

Nach Färbung mit Dinitrobenzol: Rotviolette Zone = "Substanz II"

Nach Färbung mit Phosphomolybdänsäure:

Graue Zone = Pregnantriol, Reinsubstanz.

5 Minuten bei 80° C getrocknet wird, sondern etwa 2 Stunden bei 40° C. Der Nachweis wird dadurch um das Dreifache empfindlicher (3 μ statt 10 μ).

Nach der zweiten Chromatographie ist Pregnantriol praktisch die einzige Substanz auf dem Chromatogramm. Der Nachteil einer unspezifischen Anfärbung mit Phosphomolybdänsäure spielt daher keine Rolle (Abb. 7).

Zur Identifikation des isolierten Materials wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Erstens wurde die isolierte Substanz azetyliert und damit seine Polarität und seine papierchromatographischen Eigenschaften verändert. Die Azetylierung von Pregnantriol erfolgte nach Angaben von EICHLER und FARAH²⁰: 50 μ trockenes Pregnantriol wurden mit 0,1 ml Pyridin und 0,1 ml Acetanhydrid (10 μ ige Lösung in wasserfreiem Benzol) versetzt und 22 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Zusatz von 1 ml 20 μ igem Äthanol wurde das Acetat mit 5 ml Chloroform extrahiert und einmal mit Wasser gewaschen. In derselben Weise wurde das Eluat eines Extraktes aus NB₁ azetyliert.

Da azetyliertes Pregnantriol chromatographisch schneller wandert als Pregnantriol, wurde ein neues System gewählt. Als geeignet erwies sich System F (Isooctan: Methanol: Wasser = 10 : 10 : 1; FUKUSHIMA²⁴) in dem Pregnantriol einen R_F-Wert von nur 0,03 hat. Nach Angaben von EICHLER²⁰ werden beim Pregnantriol die OH-Gruppen in Stellung 3 und 20 azetyliert, nicht jedoch die in Stellung 17. Die Abbildung 8 zeigt, daß Pregnantriol nach der oben beschriebenen Azetylierung als Monoazetat und Diazetat vorliegt und eine gute Übereinstimmung zwischen dem azetylierten reinen Pregnantriol und dem azetylierten Eluat aus System NB₁ besteht.

Zweitens wurde zur Identifikation des isolierten Materials das Absorptionsspektrum in konz. Schwefelsäure nach ZAFFARONI⁴⁹ im Beckmann DU Spektrophotometer bestimmt. Das durch eine kleine Säule (3 g Silicagel, 1 cm Durchmesser, Methanol als



Abbildung 7: Chromatogramm eines Eluates aus System NB₂ und der Reinsubstanz Pregnantriol (System NB₁) nach Färbung mit 4 %iger alkoholischer Phosphomolybdänsäurelösung.

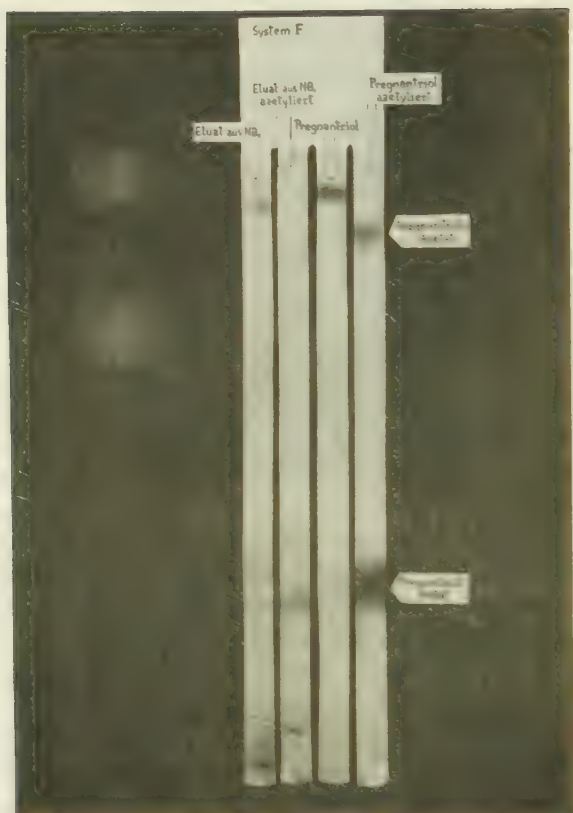


Abbildung 8: Papierchromatographie von reinem Pregnantriol, dem Eluat aus System NB₁, azetyliertem Pregnantriol und azetyliertem Eluat aus dem System NB₁. Färbung mit Phosphomolybdänsäure.

Elutionsmittel) von Papierfasern gereinigte Eluat aus NB₁ und das reine Pregnantriol zeigen übereinstimmend bei 310 m μ und 440 m μ ein Absorptionsmaximum (Abb. 9).

Reinheitsgrad des isolierten Pregnantriols: Daß das isolierte Pregnantriol keine größeren Mengen anderer Steroide, besonders Metaboliten von Cortisol und Corticosteron enthielt, wurde wie folgt nachgewiesen: 2 Patienten wurde ¹⁴C-Corticosteron und 3 H-Cortisol i.v. injiziert und der Anteil der radioaktiven Metaboliten dieser beiden Steroide im isolierten Pregnantriol bestimmt. Bei Verwendung von E₄ als 2. Chromatographiesystem wurden in einem Fall 7,4 μ radioaktive Metaboliten von Corticosteron und 104 μ radioaktive Metaboliten von Cortisol, umgerechnet auf den Tagesurin, bestimmt. Bei Verwendung von System NB₁ als 2. Chromatographiesystem wurden im zweiten Fall 29,4 μ radioaktive Metaboliten von Corticosteron und 41,7 μ radioaktive Metaboliten von Cortisol in der Pregnantriolzone bestimmt. Der Berechnung liegt eine mittlere Sekretionsrate von 3,3 mg für Corticosteron und 15,8 mg für Cortisol zu Grunde (KARL und RATH³⁶). Das würde unter Zugrundelegung einer mit der beschriebenen Methode gemessenen Pregnantriolausscheidung von 1 000 μ / die bedeuten, daß der wahre Pregnantriolspiegel im ersten Fall um 11,1 %, im zweiten Fall um 7,1 % niedriger liegt als der gemessene.

Diese Prozentzahlen spiegeln jedoch nur dann den Gehalt an Corticosteron- und Cortisol-Metaboliten wieder, wenn nachgewiesen werden könnte, daß im Organismus aus Corticosteron und Cortisol kein Pregnantriol gebildet wird. Hinweise, daß dies der Fall sein könnte, geben die Arbeiten von FUKUSHIMA²⁶ und BONGIOVANNI⁵.

Weiterhin ist zu bedenken, daß bei der Ungenauigkeit von etwa 10 % die Annahme zugrunde liegt, die in der Pregnantriolzone noch vorhandenen Steroidmetaboliten von Corticosteron und Cortisol würden bei der enzymatischen Endpunktbestimmung mit-

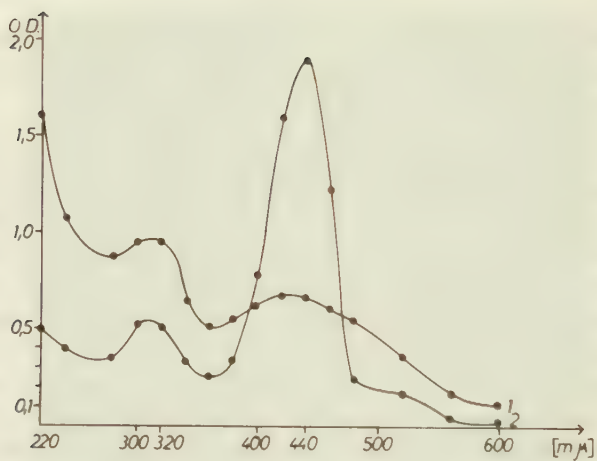


Abbildung 9: Absorptionsspektren in konz. Schwefelsäure.

1: Eluat der Pregnantriolzone aus dem Papierchromatographiesystem NB₁.

2: Reines Pregnantriol.

erfaßt. Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocorticosteron, Tetrahydrocortison und Cortisol werden bei der Chromatographie in System NB₂ mit R_F-Werten von 0,04; 0,06; 0,2 und 0,07 nicht auf das zweite Chromatographiesystem übertragen und kommen daher nicht als Beimengungen in Frage. Die wichtigsten Androgene werden auf Grund ihrer R_F-Werte ebenso nicht mitbestimmt: Androsteron (R_F = 0,92), Ätiocholanolon (R_F = 0,94), Dehydroepiandrosteron (R_F = 0,9), 11-Ketoandrosteron (R_F = 0,85). Es müßte sich demnach bei den unter Umständen mitreagierenden Metaboliten um weniger gut charakterisierte Steroide handeln.

2. Endpunktbestimmung

Die Endpunktbestimmung mit Hilfe der Steroiddehydrogenase ist der konventionellen Bestimmung des Pregnantriols mit Hilfe der Schwefelsäurereaktion überlegen: Schwefelsäure reagiert mit allen sonst noch vorhandenen Steroiden und mit anderen Begleitstoffen unter Bildung von Farbkomplexen, die eine Extinktion bei der Wellenlänge haben können und auch haben, bei der der Pregnantriolschwefelsäurekomplex maximal absorbiert. So wies z.B. NOWACZYNSKI⁴² bei der Methode von EBERLEIN¹⁷ zur Bestimmung von Pregnantriol zwei Stoffe nach, deren Schwefelsäureverbindungen ebenso wie Pregnantriol bei 440 mμ stark absorbieren. Die Spezifität der α-Hydroxysteroiddehydrogenase, die von uns zur Endpunktbestimmung benützt wurde, ist demgegenüber sehr groß, wenngleich ihr auf Grund der vereinfachten Methode zur Darstellung (nach STEMPFEL⁴⁸) in geringer Konzentration eine β-Dehydrogenase beigegeben ist. Es können somit alle 3α-Hydroxysterioide der C₁₉ und C₂₁ und C₂₄ Reihe, alle 3β-Hydroxygruppen der C₁₉ und C₂₁ Reihe und die 17β und 16β Hydroxygruppen der C₁₈ und C₁₉ Reihe oxydiert werden (STEMPFEL⁴⁸).

Bei der Schwefelsäurereaktion ist außerdem das Ausmaß der Komplexbildung stark abhängig von äußeren Faktoren, wie z.B.

von der Dauer der Einwirkung, der Umgebungstemperatur und von der Konzentration der zu bestimmenden Substanz. Dagegen ist die enzymatische Bestimmungsmethode unabhängig von diesen Faktoren. Die Entstehung des gut definierten NADH ist allein abhängig von der Menge des umsetzbaren Steroids. Es besteht eine streng lineare Beziehung zwischen der Menge des Steroids und der NADH Konzentration. (Abb. 10)

Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Bestimmungsmethode ergibt sich aus der eben schon erwähnten Tatsache, daß für die Berechnung nur die Änderung der optischen Dichte entscheidend ist und daher eine durch irgendwelche Begleitstoffe hervorgerufene Pigmentierung des Bestimmungsansatzes oder Verunreinigung mit Papierbestandteilen nach dem Eluieren unwesentlich ist. Bei der Schwefelsäurereaktion müssen dagegen vorhandene Verunreinigungen im Extrakt möglichst beseitigt werden, da ja die absolute Extinktion gemessen wird.

Die zur Bestimmung von reinen Steroiden angegebene Meßtechnik (Feststellung des Extinktionsunterschiedes der Versuchskuvette gegenüber einer Vergleichskuvette, die, abgesehen von dem Steroid, dieselben Bestandteile wie die Versuchskuvette enthält; HURLOCK³²) war zur Bestimmung des Pregnatriols aus dem Papiereluat ungeeignet, da die Versuchskuvette in diesem Fall infolge der Pigmentierung des Eluats eine wesentlich größere optische Dichte aufweist als die Vergleichskuvette. Ein Ausgleich durch Differenzverfahren erwies sich als nicht reproduzierbar.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde versucht, einen Papierleerwert zum Vergleich heranzuziehen. Dieser Papierleerwert zeigte jedoch zu große Schwankungen in der optischen Dichte gegenüber der Versuchskuvette, so daß auf diese Weise keine zuverlässigen Messungen durchgeführt werden konnten.

Eine brauchbare Methode wurde erst dadurch erzielt, daß je die Hälfte des Papiereluats in die Versuchs- und Vergleichskuvette gebracht wurde. Um zu verhindern, daß nach Zusatz des

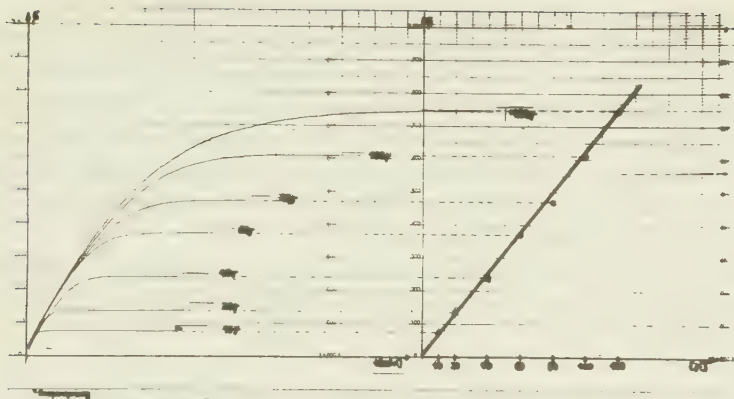


Abbildung 10: Eichkurve für Pregnantriol nach Reaktion mit α -Hydroxysteroiddehydrogenase.

Ordinate: Extinktion Abszisse links: Zeit

Abszisse rechts: Pregnantriolmenge.

Enzyms auch in der Vergleichskuvette die Reaktion abläuft, wurde dieser inaktiviertes Enzym (aktives Enzym: Parahydroxy-mercuribenzoat = 4 : 1) zugesetzt, das praktisch dieselbe optische Dichte wie das aktive Enzym besitzt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt aber darin, daß die Hälfte des isolierten Materials in der Vergleichskuvette benützt werden muß und dementsprechend ein größerer Teil der Urintagesmenge zur Bestimmung verwendet werden mußte.

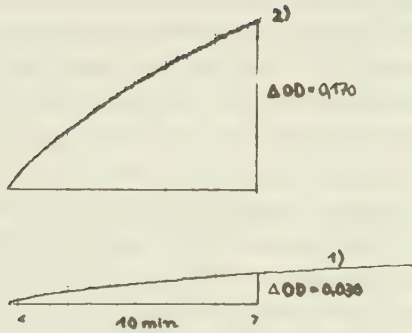
Die exakteste und einfachste Art der Messung gelang schließlich mit nur einer Kuvette, wie im methodischen Teil näher ausgeführt.

Bei der im methodischen Teil genau beschriebenen enzymatischen Endpunktbestimmung fiel auf, daß die optische Dichte, ehe die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wurde, im sogenannten Vorlauf geradlinig ganz langsam zunahm. Es mußte also im Ansatz eine Reaktion ablaufen, die eine Zunahme der optischen Dichte bei 340 m μ bewirkte. Die verschiedenste Kombination der einzelnen Bestandteile des Testansatzes ergab, daß dieser Anstieg allein durch Mischung von Hydrazinhydrat und NAD erfolgte. Eine Bestätigung dieser Vermutung fand sich bei BERGMAYER³:

"DPN bildet mit Hydrazinhydrat eine bei 303 m μ absorbierende Verbindung, deren Absorption auch bei 336 m μ noch beträchtlich ist. Die Blindreaktion ist in den ersten Sekunden sehr schnell (Extinktionszunahme bis zu 0,030). Dann schleicht sie mit einer Geschwindigkeit von $\Delta E/30 \text{ min.} = 0,005 - 0,020$."

Ein Beispiel zeigt die Abb. 11. Zu 1 ml Hydrazinhydrat wurden hinzugefügt: 1) 0,1 ml $5 \cdot 10^{-3}$ M DPN und 2) 0,1 ml $3 \cdot 10^{-2}$ M DPN. Man erkennt den durch Zugabe von DPN erfolgten initialen Anstieg der Extinktion. Bei einer Reaktionszeit von 10 min beträgt die Extinktionszunahme bei 1) $\Delta OD_1 = 0,030$, bei 2) $\Delta OD_2 = 0,170$.

Läuft diese Reaktion auch nach Zugabe des Enzyms neben der Hauptreaktion (Bestimmung des Pregnantriols) ab, so würde das bei einer 10 minütigen Reaktionsdauer bedeuten, daß im Falle



1 ml
Hydrazin
hydrat

↑ DPN-Zusatz

Abbildung 11: Reaktion von 1 ml Hydrazinhydrat mit DPN.

1) 0,1 ml $5 \cdot 10^{-3} \text{ M DPN}$

2) 0,1 ml $3 \cdot 10^{-2} \text{ M DPN}$ (siehe Text).

1) eine um 5 μ (entsprechend ΔOD_1) größere Pregnantriolmenge, im Falle 2) eine um 28 μ (entsprechend ΔOD_2) zu große Pregnantriolmenge bestimmt wird. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, daß diese Reaktion bei größeren DPN Konzentrationen stärker ins Gewicht fällt.

Der Nachweis, ob die Reaktion zwischen DPN und Hydrazinhydrat während der Hauptreaktion, genau so wie beschrieben, weiterläuft, ist schwierig. Ein Hinweis für eine "Weiterreaktion" wäre ein dem Vorlauf paralleler Nachlauf. Der Nachlauf war jedoch flacher oder fehlte ganz und konnte somit nicht zu einer Aussage verwendet werden.

Folgende Beobachtung macht es jedoch wahrscheinlich, daß diese Nebenreaktion während der Hauptreaktion vernachlässigt werden kann: Dem schon einige Minuten miteinander reagierenden Gemisch aus DPN und Hydrazinhydrat wurden 0,05 ml Enzym zugesetzt. Es ergab sich nach einem kleinen Anstieg der Extinktion (auf Grund der Eigenabsorption des Enzymproteins) ein Abfall der Extinktion und dann wieder ein allmählicher Anstieg (Abb. 12). Wie die Abbildung 12 zeigt, erfolgt



Abbildung 12: Einfluß der Hydroxysteroiddehydrogenase auf die durch die Komplexbildung von Hydrazinhydrat mit DPN bedingte Extinktionszunahme.

erst nach 35 Minuten eine Zunahme der optischen Dichte durch die Nebenreaktion. In dieser Zeit wäre die Hauptreaktion (enzymatische Oxydation von Pregnantriol) abgelaufen.

Um diese Unsicherheitsfaktoren bei der Messung auszuschalten, wäre in Betracht gekommen, anstelle Hydrazinhydrat, ein anderes ketonbindendes Reagenz heranzuziehen.

Nach Angaben von HURLOCK³² sind Hydroxylamin und Semicarbazid ungeeignet, da sie das α -Enzym leicht hemmen. Hydroxylamin reagiert außerdem mit DPN. Daher wurde versucht, nach Weglassen des Hydrazinhydrats aus dem Testansatz, das Gleichgewicht der Reaktion durch hohen DPN- und Enzymüberschuß zu verlagern. Dabei war jedoch der Steroidumsatz in der Zeiteinheit sehr gering, so daß auf diese Weise keine befriedigende Messung erzielt werden konnte.

Eine Möglichkeit bestünde nach Angaben von HOLZER³¹, anstelle von DPN das 3-Acetylpyridin-analoge des DPN zu verwenden, welches das Gleichgewicht einer DPN-abhängigen enzymatischen Reaktion zu Gunsten der Substratoxydation verlagert, ohne daß das Produkt der Dehydrierungsreaktion abgefangen werden muß. Dies wurde nicht geprüft.

Da, wie oben ausgeführt, Grund zu der Annahme besteht, daß die Nebenreaktion das Ergebnis nicht wesentlich verfälscht, wurde dieser geringe Unsicherheitsfaktor bei der Endpunktbestimmung in Kauf genommen.

Unsere Untersuchungen zeigten außerdem, daß der Nachlauf der Fermentreaktion bei Testung von Reinsubstanzen einen annähernd konstanten Wert der Extinktion zeigte, bei der Messung des Pregnantriols aus dem Eluat jedoch eine leicht steigende Tendenz aufwies. Dadurch konnte die endgültige Extinktionszunahme nicht sicher abgelesen werden. Die Vermutung, daß es sich bei diesem Anstieg um den langsam ablaufenden Umsatz geringer Mengen von Steroiden mit 3 β OH- und 17 β OH-Gruppen

durch die β -Dehydrogenase handelt, wurde durch einen Versuch nachgewiesen: Drei Eluate der Pregnantriolzone aus System NB₁, denen derselbe Anteil einer Urintagesmenge zugrundeliegt, wurden in folgender Weise der Endpunktbestimmung unterworfen (Abb. 13):

Kurve 1 zeigt den Ablauf der Reaktion nach Zugabe von 0,05 ml Enzymlösung. Kurve 2 zeigt den Ablauf der Reaktion nach Zugabe von 0,2 ml Parahydroxymercuribenzoat und 0,05 ml Enzymlösung (nach STEMPFEL⁴⁸ kann das α -Enzym durch Zugabe von 0,2 ml $1 \cdot 10^{-2}M$ Lösung Parahydroxymercuribenzoat zur Meßkuvette inaktiviert werden, ohne daß dabei das β -Enzym beeinträchtigt wird). Wie die Abbildung 13 zeigt, ist der Nachlauf der Kurve 1 (hypothetische Oxydation von Steroiden durch die β -Dehydrogenase) identisch mit dem Ablauf der Kurve 2 (Oxydation von Steroiden durch das β -Enzym). Um auszuschließen, daß ΔOD_2 auf einer unspezifischen Zunahme der optischen Dichte beruht, wurde in Reaktion 3 das dritte Eluat aus NB₁ mit völlig inaktiviertem Enzym (Enzym: Parahydroxymercuribenzoat = 1 : 4) versetzt. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Anstieg der optischen Dichte (Abb. 13).

Damit darf als bewiesen gelten, daß der Nachlauf auf Umsatz von Steroiden durch das β -Enzym beruht. Da angenommen werden kann, daß diese Reaktion mit der Zugabe der Enzymlösung beginnt und gleichzeitig mit der Hauptreaktion abläuft, ist es möglich, sie durch Extrapolation zu eliminieren (Abb. 4).

Um den unbedeutenden Fehler, der durch die Extrapolation und die Subtraktion der Eigenabsorption des Enzyms entsteht, auszuschalten, wurde letztlich versucht, das nach STEMPFEL⁴⁸ dargestellte Enzymgemisch nach Angaben von DELIN¹⁶ auf Sephadex G 100 in seine verschiedenen Komponenten aufzutrennen. Es wurden einige Proteinfractionen abgetrennt und dadurch das Enzymgemisch besser gereinigt. Die Eigenabsorption des Enzyms konnte jetzt vernachlässigt werden. Die Trennung der α - und β -Dehydrogenase gelang jedoch

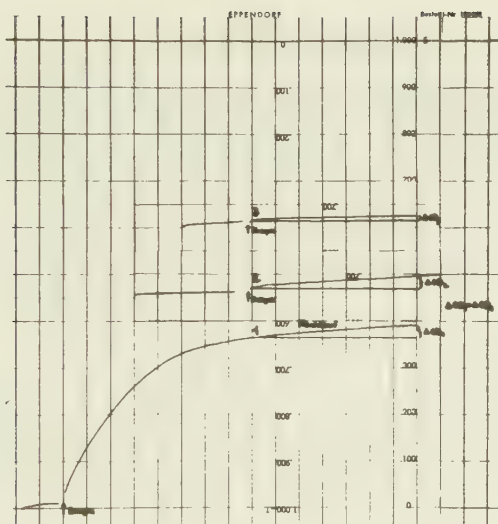


Abbildung 13: Verlauf der Extinktion bei folgenden enzymatischen Endpunktbestimmungen:

Kurve 1: Eluat der Pregnantriolzone aus dem 2. Papierchromatographiesystem (NB_1) nach Zusatz von α - und β -Dehydrogenase.

Kurve 2: Eluat der Pregnantriolzone aus dem 2. Papierchromatographiesystem (NB_1) nach Zusatz von β -Dehydrogenase.

Kurve 3: Eluat der Pregnantriolzone aus dem 2. Papierchromatographiesystem NB_1 nach Zusatz von inaktivierter α - und β -Dehydrogenase.

nicht. Beide Enzyme erschienen in gemeinsamen Fraktionen und zwar mit als erste Proteinfractionen aus der Säule, ein Hinweis für das hohe Molekulargewicht der Enzymproteine. Auch eine Chromatographie auf Sephadex G 200 ergab analoge Ergebnisse.

E ZUSAMMENFASSUNG

In einer Literaturübersicht wird über die Isolierung, die Biosynthese von Pregnantriol und über den Einfluß von ACTH auf die Pregnantriolausscheidung berichtet. Eine Tabelle gibt Aufschluß über die Pregnantriolausscheidung bei Gesunden und bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. Anschließend werden die Grundzüge aller bekannten Methoden zur Bestimmung von Pregnantriol beschrieben.

Ziel der Arbeit war nachzuweisen, daß eine enzymatische Bestimmung von Pregnantriol mit α -Hydroxysteroiddehydrogenase möglich ist, nachdem das Steroid möglichst rein durch Papierchromatographie in zwei verschiedenen Systemen separiert wurde.

Die Methode zerfällt in folgende wesentliche Schritte: Die Hydrolyse, die Extraktion und die Reinigung des Steroids durch Verteilung erfolgen nach den üblichen Vorschriften.

Zur Isolierung werden zwei Papierchromatographiesysteme vom Typ BUSH benötigt, die sich in ihren Trenneigenschaften wesentlich unterscheiden. Das so isolierte Steroid wird durch eine α -Hydroxysteroiddehydrogenase (aus *Pseudomonas testosteroni*), die den Wasserstoff der β -OH-Gruppe auf zugefügtes NAD überträgt, bestimmt. Das entstehende NADH wird photometrisch gemessen.

In der Diskussion werden die einzelnen Schritte der Methode, zum Teil durch Untersuchungen begründet und kritisiert.

Um das isolierte Steroid zu identifizieren, wurde es azetyliert und in einem anderen Papierchromatographiesystem mit der azetylierten Reinsubstanz verglichen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung. Außerdem wurde das UV-Spektrum von dem isolierten Steroid aufgenommen. Die Maxima der Absorption

stimmten mit denen der Reinsubstanz überein.

Um festzustellen, inwieweit das isolierte Steroid mit Metaboliten der beiden wichtigsten Steroide Corticosteron und Cortisol verunreinigt ist, wurden zwei Versuchspersonen Corticosteron und Cortisol in radioaktiver Form zugeführt. Es ergab sich, daß Metaboliten von Corticosteron und Cortisol, die sich chemisch von Pregnantriol nur geringfügig unterscheiden, zu etwa 9 % am "isolierten Steroid" beteiligt sind. Wieviel Prozent davon bei der spezifischen Endpunktbestimmung mitgeraßt werden, konnte nicht festgestellt werden.

Die Endpunktbestimmung mittels der Steroiddehydrogenase ist der konventionellen Farbreaktion mit Schwefelsäure überlegen. Schwefelsäure reagiert nämlich mit allen im Testansatz vorhandenen Substanzen unter Bildung von Farbkomplexen, wohingegen die Steroiddehydrogenase nur ganz bestimmte OH-Gruppen am Steroidmolekül angreift.

Die fermentative Bestimmung von Pregnantriol ist außerdem unabhängig von der Einwirkungszeit, der Umgebungstemperatur und der Konzentration des zu bestimmenden Pregnantriols.

Einer einfachen Messung der durch das entstandene NADH bedingten Extinktionszunahme gegen eine Leerkuvette standen folgende Schwierigkeiten im Weg: a) Das Eluat aus dem Papierchromatogramm zeigte eine leichte Pigmentierung und war mit Papierfasern verunreinigt. b) Es wurde eine Extinktionszunahme festgestellt, die durch Reaktion von NAD mit Hydrazinhydrat entstand. c) Eine gleichzeitig mit der Messung von Pregnantriol ablaufende Reaktion verfälschte die Ergebnisse. Es handelte sich um den Umsatz von β -OH-Gruppen durch eine β -Dehydrogenase, die der α -Dehydrogenase in geringer Konzentration beigegeben ist. Diese Schwierigkeiten wurden folgendermaßen umgangen: a) Es wurde die absolute Zunahme der optischen Dichte nach dem Start der Reaktion gemessen. b) Es

konnte gezeigt werden, daß die Reaktion von NAD mit Hydrazinhydrat nach Zugabe des Enzyms vernachlässigt werden kann.

c) Durch graphische Aufzeichnung des Reaktionsablaufes konnte die störende Reaktion, verursacht durch die β -Dehydrogenase, extrapoliert werden.

Bei insgesamt 20 Gesunden und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wurde die beschriebene Methode zum Nachweis von Pregnantriol im Urin angewandt.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Beisenherz, G., Bücher, Th. und Garbade, K.H.
in Colowick, S.P. und Kaplan, N.O.: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1955, Bd. I S. 391
2. Bell, M. and Varley, H.: The Estimation of Pregnanetriol and 17-OH-Pregnanolone in Urine in Congenital Adrenal Hyperplasia, Clin. Chim. Acta 5, 396-405 (1960)
3. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie 1962, S. 275
4. Bongiovanni, A.M. and Clayton, G.W. Jr.: A simplified method for the determination of Pregnanediol and Pregnanetriol in Urine, Bull. Johns Hopk. Hosp. 94, 180-186 (1954)
5. Bongiovanni, A.M., Eberlein, W.R. and Caddell, J.L.: Differences in Metabolism of Reichstein's Substance S in Normal Adults and Children, J. clin. Invest. 37, 1087-1092 (1958)
6. Bongiovanni, A.M. and Eberlein, W.R.: Measurement of Pregnanetriol in Plasma, J. clin. End. 24/12, 1312-1317 (1964)
7. Bongiovanni, A.M. and Eberlein, W.R.: Critical Analysis of Methods for Measurement of Pregnane-3-alpha, 17-alpha, 20-alpha-triol in Human Urine, Analyt. Chem. 30, 388-393 (1958)
8. Bush, I.E. and Mahesh, V.B.: Adrenocortical Hyperfunction With Sudden Onset of Hirsutism, J. Endocrin. 18, 1-25 (1959)

9. Butler, G.C. and Marrian, G.F.: The isolation of pregnane 3-17-20-triol from the urine of women showing the adrenogenital syndrome, J. biol. Chem. 119, 565 (1937)
10. Childs, B., Grumbach, M.M. and van Wyk, J.J.: Virilizing Adrenal Hyperplasia; A Genetic and Hormonal Study, J. clin. Invest. 35, 213 (1956)
11. De Courcy, C.: A trichloroacetic reagent for the detection of pregnane-3, 17, 20 triols on paper chromatograms, J. Endocrin. 14, 164-170 (1956)
12. Cox, R.I.: The Separation and quantitative Estimation of Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -triol, Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -triol-11-one and other Urinary Acetaldehydogenic Steroids, J. biol. Chem. 234, 1693-1697 (1959)
13. Cox, R.I. and Finckelstein, M.: Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol and Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol-11-one Excretion by Patients with adrenocortical Dysfunction, J. clin. Invest. 36, 1726-1734 (1957)
14. Cox, R.I. and Marrian, G.F.: The Isolation of Pregnanetriol from the Urine of normal Men, Biochem. J. 54, 353 (1953)
15. Crepy, O., Judas, O., F. Rulleau-Meslin, Jayle, M.F.: Mode de Conjugaison Des Métabolites De La Progestérone Dans Les Urines Des Femmes Enceintes, Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 1-6, 327-336 (1962)

16. Delin, S. and Porath, J.: Purification Of α -And β -Hydroxy-steroid Dehydrogenases From *Pseudomonas Testosteroni* By Gel Filtration, *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 197-200 (1963)
17. Eberlein, W.R. and Bongiovanni, A.M.: A Paper Chromatographic Method for the Measurement of Pregnane-diol in Urine, *J. clin. End.* 18, 300 (1958)
18. Eberlein, W.R. and Bongiovanni, A.M.: New Solvent Systems for the Resolution of Corticosteroids by Paper Chromatography, *Arch. Biochem. a. Biophys.* 59, 90-96 (1955)
19. Edwards, R.W.H., Kellie, A.E. and Wade, A.P.: The Extraction and oxidation of urinary steroid conjugates, *Mem. Soc. Endocrinol.* 2, 53-63 (1953)
20. Eichler, O. and Farah, A.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, 14. Band, Teil 1: The Adrenocortical Hormones, p. 240
21. Faredin, I., Szavast, Toth I., David, M.A.: Steroid Studies on Florisil absorbent Column, IV Pregnanetriol Determination in human Urine, *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 20/2, 193-207 (1964)
22. Faredin, I., Szavast, Toth, I., David, M.A.: Pregnanetriol Studies in Hirsutism and other Endocrine Diseases, *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 20/3, 327-338 (1964)
23. Fotherby, K. and Love, D.N.: A Modified Method For The Estimation of Pregnanetriol In Urine, *J. Endocrin.* 20, 157-162 (1960)

24. Fukushima, D.K., Bradlow, H.L., Hellman, L. and Gallagher, T.F.: Further Studies on the Origin of Pregnanetriol in Adrenal Carcinoma, J. clin. End. 23, 266-273 (1963)
25. Fukushima, D.K. and Gallagher, T.F.: Steroid Isolation Studies in Congenital Adrenal Hyperplasia, J. biol. Chem. 229, 85 (1957)
26. Fukushima, D.K. and Gallagher, T.F.: Absence of 21-Dehydroxylation in Congenital Adrenal Hyperplasia, J. clin. End. 18, 694-698 (1958)
27. Goldzieher, W. and Nakamura, P.: A clinical Method for the Determination of Urinary Pregnenediol and Pregnanetriol, Acta endocr. 41, 371 (1962)
28. Herman, R.H. and Bruton, J.: Reaction of Antimony Pentachloride with Pregnane-3 α , 17 α , 20 α Triol, Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol-11-one and other adrenal cortical steroids, Nature Vol. 190 No 4774, p. 444-445 (1961)
29. Herrmann, W. and Silverman, L.: Method for Determination of Urinary Pregnane-3-Alpha, 17-Alpha, 20-Alpha Triol, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 94, 426 (1957)
30. Herrmann, W. and Silverman, L.: Excretion of Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol in Pregnancy, J. clin. End. 17, 2 1482 (1957)
31. Holzer, H. und Sölling, H.D.: L(+)-Lactat Bestimmung. Bestimmung mit Laktat-Dehydrogenase und dem 3-Acetylpyridin Analogen des DPN (AP-DPN), in Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie 1962, S. 275

32. Hurlock, B. and Talalay, P.: Principles Of The Enzymatic Measurement Of Steroids, J. biol. Chem. 227, 37-51 (1957)
33. Jacobs, Burstein, Lieberman: The Cleavage of Androsteron-B-D-glucopyranosiduronic Acid in Organic Media, J. Am. Chem. Soc. 82, 1226 (1960)
34. Kinoshita and Isurugi, K.: Gaschromatographische Bestimmung von Pregnanediol, Pregnanetriol, Pregnanetriolone u. Pregnanetriol. Folia endocr. Jap. 40/7, 978-981 (1964)
35. Jailer, J.W., Gold, J.J., Wiele, R.V. and Lieberman, S.: 17 α -OH Progesteron and 21-Desoxyhydrocortisone; Their Metabolism and Possible Role in Congenital Adrenal Virilism, J. clin. Invest. 34, 1639-1646 (1955)
36. Karl, H.J. und Raith, L.: Die Corticosteronsekretion beim Menschen. 3. Mitteilung. Die Sekretionsrate von Corticosteron und Cortison bei Stimulierung der Nebennierenrinde mit ACTH, Klin. Wschr. 44,6; 303-306 (1966)
37. Leon, Y.A. and Bulbrook, R.D.: A Modification of a method for the Determination of Urinary Pregnanetriol, J. Endocrin. 20, 236-245 (1960)
38. Lowry, O.H., Roberts, N.R., Kappahn, J.J. and Lewis, C.: Fluorimetry of oxidized and reduced pyridine nucleotides and microanalytical applications, Federation Proc. 15, 304 (1956)
39. Marcus, P.I. and Talalay, P.: Induction and Purification of α - and β -Hydroxysteroid Dehydrogenases, J. Biol. Chem. 218, 661-674 (1956)

40. Martin, M.M., Reddy, W.J. and Thorn, G.W.: Method for the simultaneous determination of Pregnanediol and Pregnanetriol: Estimation of urinary excretion in normal subjects and in ten Patients with adrenocortical disorder, J. clin. End. 21, 923 (1961)
41. Neher, W. und Wettstein, A.: Über Steroide. Farbreaktionen mit Steroiden, insbesondere Corticosteroiden, im Papierchromatogramm, Helv. Chim. Acta 34, 2278-2285 (1951)
42. Nowaczynski, W., Koiw, E. and Genest, J.: Method For Determination of Urinary 5 β -Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol And Δ^5 -Pregnene-3 β , 17 α , 20 α -Triol, J. clin. End. 20, 1503-1514 (1960)
43. Pickett, M.T., Stern and Sommerville: Urinary Pregnanetriol throughout the menstrual cycle, Lancet 2, 829 (1959)
44. Raphael, R.D., Bergada, C. and Migeon, J.C.: Isolation, Identification and Measurement of 3 α -17 α -Dihydroxy-pregnane-11,20-dione in Congenital Adrenal Hyperplasia, J. clin. End. 25, 322-326 (1965)
45. Savard, K.: Paper Partition Chromatographie of C₁₉ and C₂₁ Ketosteroids, J. biol. Chem. 202, 457 (1953)
46. Starka, L. and Malikova, J.: A Simple Method For The Separation of Pregnanetriols by spread-layer chromatography, J. endocr. 22, 215 (1961)

47. Stern, M.J.: A Method for the Determination of 5 β -Pregnane-3 α , 17 α , 20 α -Triol in Urine, J. Endocrin. 16, 180-188 (1957)
48. Stempfel, R.S. and Sidbury, J.: Studies with the Hydroxysteroid Dehydrogenases: I. A simplified Method for the Enzymatic Estimation of 3- and 17-Hydroxysteroids, J. clin. End. 24, 367-374 (1964)
49. Zaffaroni, A.: Absorption Spectra of Sulfuric Acid Chromogens obtained from adrenal Steroids and related Compounds, J. Am. Chem. Soc. 72, 3828 (1950)

Lebenslauf

Ich, Dietrich Rauhut, wurde am 18.1.1942 in Breslau als Sohn des damaligen Studienassessors Gerhard Rauhut und seiner Ehefrau Edith Rauhut, geborene Tiroke, geboren. Ich bin deutscher Staatsbürger und gehöre wie meine Eltern der evangelisch-lutherischen Kirche an. Im Jahre 1945 mußte ich mit meiner Mutter die Heimat verlassen. Nach mehreren kurzfristigen Zwischenaufenthalten zogen wir 1947 nach Dinkelsbühl, da mein Vater an der dortigen höheren Schule eine Stellung fand. Dort besuchte ich von 1948 - 1952 die Volksschule und ab 1952 die Oberrealschule, an der ich 1961 das Abitur absolvierte. Von 1961 - 1967 studierte ich 11 Semester Medizin an der Universität München. Im Juni 1967 bestand ich die ärztliche Prüfung.

